

Ein Beitrag zur fermentativen Oxydation von Morphin und Pseudomorphin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Helmut Simon

aus

Leipzig

1963

Ein Beitrag zur fermentativen Oxydation von Morphin und Pseudomorphin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Helmut Simon

aus

Leipzig

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. K.-H. Frömming

2. Referent: Prof. Dr. N. Kreutzkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 3. 1963

Tag der Promotion: 24. Juli 1963



Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. K.-H. Frömming am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. K.-H. Frömming bin ich für die Überlassung des Themas, für wertvolle Hinweise bei der Durchführung der Arbeit, für die Unterstützung beim Literaturstudium und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion sich ergebender Probleme zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. G. Schenck danke ich herzlich für die Unterstützung und das Interesse, das er meiner Arbeit und meiner wissenschaftlichen Fortbildung jederzeit entgegengebracht hat.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. Einleitung	7
B. Problemstellung	10
C. Allgemeiner Teil	
I. Manometrische Untersuchungen der Systeme Phenoloxydase/Morphin und Phenoloxydase/Über- träger/Morphin	12
1. Einwirkung von Phenoloxydase auf Morphin	12
a. Kartoffel-Phenoloxydase	12
b. Champignon-Phenoloxydase	12
2. Einwirkung von Phenoloxydase auf p-Cumar- säure und p-Cumarsäure/Morphin	14
a. Kartoffel-Phenoloxydase	14
b. Champignon-Phenoloxydase	18
3. Einwirkung von Phenoloxydase auf Kaffee- säure und Kaffeesäure/Morphin	20
a. Kartoffel-Phenoloxydase	20
b. Champignon-Phenoloxydase	21
II. Untersuchungen zum Verhalten von Morphin und Pseudomorphin bei Einwirkung von Was- serstoffperoxid/Peroxydase	24
1. Einwirkung von Wasserstoffperoxid/Peroxy- dase auf Morphin	24
2. Einwirkung von Wasserstoffperoxid/Peroxy- dase auf Pseudomorphin	29
III. Untersuchungen zum Verhalten von Pseudomor- phin in den Systemen Phenoloxydase/Pseudo- morphin und Phenoloxydase/Überträger/Pseu- domorphin	31
1. Kolorimetrische Bestimmung von Pseudomor- phin	31
2. Einwirkung von Phenoloxydase auf Pseudo- morphin	34
3. Einwirkung von Phenoloxydase auf p-Cumar- säure/Pseudomorphin	36
4. Einwirkung von Phenoloxydase auf Kaffee- säure/Pseudomorphin	39

D. Experimenteller Teil

I. Beschreibung der Versuche 44

1. Manometrische Messungen 44

2. Spektralphotometrische Messungen 44

3. Quantitative kolorimetrische Pseudomorphinbestimmung 44

4. Papierchromatographie 44

II. Beschreibung der verwendeten Substanzen 46

1. Kartoffel-Phenoloxydase 46

2. Champignon-Phenoloxydase 46

3. Meerrettich-Peroxydase 47

4. Pufferlösung 47

5. Wasserstoffperoxid 47

6. Morphin 47

7. Pseudomorphin 48

8. 3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeesäure) 49

9. 4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure) 49

10. Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz 49

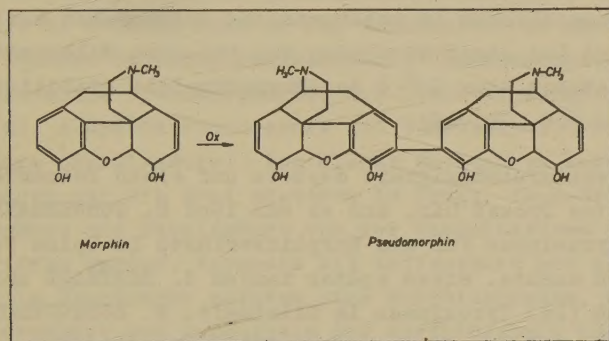
E. Zusammenfassung 50

F. Literaturverzeichnis 53

A. Einleitung

=====

Pseudomorphin (2,2'-Oxydimorphin) entsteht bei der Oxydation des Morphins. Sowohl bei der Oxydation mit anorganischen Oxydationsmitteln, wie Kaliumhexacyanoferrat-III (1, 2, 3, 4, 5), Kaliumpermanganat (6) oder Luftsauerstoff und Ammoniak (7), als auch bei der Einwirkung des Oxydationsenzym Peroxydase (8) wird diese dimere Verbindung gebildet. Bei der Sterilisierung wäßriger Morphinlösungen macht sich die autoxydative Pseudomorphinbildung störend bemerkbar (9, 10, 11).



C. KOLLO (12) zeigte, daß bei der Autoxydation neben Pseudomorphin noch Morphin-N-oxid im Verhältnis 9:1 gebildet wird.

Noch nicht geklärt ist jedoch bisher das Auftreten des Pseudomorphins als Oxydationsprodukt bei der fermentativ bedingten Morphinabnahme während der Gewinnung und Lagerung des Opiums. Das Pseudomorphin wurde 1835 von J. PELLÉTIER (13) im Opium entdeckt; es ist darin nur in sehr geringer Konzentration vorhanden, CH. C. FULTON (5) gibt den Gehalt mit 0,02 - 0,04% an, eine Menge, die den bei der Opiumgewinnung festgestellten Morphinverlusten nicht entspricht. O. HESSE (14) machte den Einwand, daß dieses Alkaloid vielleicht erst während der Extraktion des Opiums auf nichtenzymatischem Weg entsteht. Es ist also als ungeklärt anzusehen, ob Pseudomorphin schon im Milchsaft

von Papaver somniferum L. enthalten ist oder erst durch sekundäre Prozesse nach dem Anritzen der Kapseln bei Luftzutritt entsteht. Trotzdem dürfte die Aussage, daß die Morphinverluste während der Opiumgewinnung zu einer höchstens sehr geringen Pseudomorphinzunahme führen, erlaubt sein.

Die Abnahme des Morphingehaltes im Opium beschäftigt die Forschung schon über 60 Jahre. Die Angaben über die Morphinverluste schwanken allerdings in weiten Grenzen (15, 16, 17); es wird über Abnahmen bis zu 50% berichtet (18, 19). Häufig wurde die Beobachtung gemacht, daß diese Verluste im wesentlichen in unbehandelten Opiumproben auftreten, während bei einer Trocknung des frischen Milchsafte bei Temperaturen über 60° C der Morphingehalt stabilisiert werden kann (20, 21, 22).

Diese Temperaturabhängigkeit deutete auf einen fermentativ bedingten Prozeß hin, und es war 1906 M. GONNERMANN (23), der eine Tyrosinase für die Morphinverluste im Opium verantwortlich machte. Etwas später fanden G. BERTRAND und V. J. MEYER (24) Tyrosinase im Milchsaft. E. BOURQUELOT (25) beobachtete, daß bei Zugabe eines Pilzpreßsaftes zu einer alkoholischen Lösung von Morphin eine weiße Fällung auftrat, die J. BOUGAULT (26) als Pseudomorphin identifizierte. G. BERTRAND wiederum schrieb diese Reaktion der Tyrosinase zu.

Auch eine Reihe anderer Autoren beschäftigte sich mit dem Vorkommen und der Einwirkung von Enzymen auf Morphin im Mohnmilchsaft (16, 18, 20, 27, 28, 29). Die Morphinverluste wurden dabei verschiedenen Fermenten zugeschrieben, so daß deren Wirkungsmechanismus auf das Morphin bisher noch sehr umstritten und ungeklärt war.

Wichtig sind in diesem Zusammenhang die Untersuchungen von W. WIECHULA (30) und E. SCHWALB (31), die eine Erklärung für die Morphinverluste brachten. W. WIECHULA konnte in dem von ihm selbst kultivierten Mohn nur Phenoloxydase nachweisen und eine angereicherte Präparation dieses Fermentes gewin-

nen; die Teste mit Guajakharztinktur nach C. F. SCHÖNBEIN (32) und nach A. PURR (33) auf Peroxydase verliefen dagegen negativ. Er zeigte weiter, daß der Morphinverlust in Milchsaft-Wasser-Mischungen der Fermentaktivität proportional ist, daß darüber hinaus eine Morphinabnahme überhaupt nur im Temperaturbereich der Fermentaktivität auftritt, und daß die Phenoloxydase allein nicht in der Lage ist, Morphin zu verändern. Auf Grund dieser Beobachtungen zog E. SCHWALB (31) den Schluß, daß die Phenoloxydase möglicherweise durch Zwischenschaltung eines phenolischen Überträgers das Morphin in sekundärer Reaktion oxydieren könne. Aus der Literatur waren ähnliche Reaktionen bekannt (34, 35, 36, 37, 38). E. SCHWALB fand in den Mohnkapseln an phenolischen Stoffen 3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeensäure), 4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure), 6,7-Dihydroxycumarin (Aesculetin), 4-Hydroxybenzoesäure und 3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure (Ferulasäure). Von diesen Substanzen kamen als Überträger nur die drei ersteren in Frage, da 4-Hydroxybenzoesäure und Ferulasäure von der Phenoloxydase nicht angegriffen werden. Versuche mit Kaffeensäure und p-Cumarsäure als Überträger zeigten eine Morphinabnahme, während in Anwesenheit von Aesculetin der Morphingehalt konstant blieb. Die Frage, wie das Morphin bei diesen Reaktionen verändert wird, blieb dabei offen.

B. Problemstellung

Die durchzuführenden Untersuchungen ergaben sich aus den Resultaten der Arbeiten von W. WIECHULA (30) und E. SCHWALB (31). Zunächst sollten die von E. SCHWALB erarbeiteten Ergebnisse der Morphinabnahme in den Systemen Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Morphin und Phenoloxydase/Kaffeensäure/Morphin durch die Verfolgung der Reaktionen auf manometrischem Wege ergänzt werden, um eventuell dadurch einen Einblick in die Umsetzung des Morphins zu gewinnen.

Darüber hinaus kam es darauf an, die Rolle des Pseudomorphins in diesen Reaktionen zu klären. Pseudomorphin als Reaktionsprodukt des Morphins konnte in den beiden Systemen von E. SCHWALB nicht gefunden werden; allerdings suchte er auch nicht systematisch danach. Das widerspricht den schon erwähnten Ergebnissen von G. BERTRAND (24), E. BOURQUELOT (25) und J. BOUGAULT (26), die bei Zusatz von Phenoloxydase zu Morphin Pseudomorphin als Oxydationsprodukt fanden. Diese Autoren verwendeten für ihre Versuche jedoch keine definierten Fermentpräparationen sondern Pilzpresssaft, so daß möglicherweise neben der Phenoloxydase anwesende phenolische Begleitstoffe als Überträger wirkten, oder auch das Oxydationsenzym Peroxydase verantwortlich war. K.-H. FROMMING (8) konnte nämlich durch papierchromatographische Untersuchungen zeigen, daß bei der Einwirkung von Wasserstoffperoxid-Peroxydase eine Oxydation des Morphins zu Pseudomorphin erfolgt; in Modellversuchen sollte geklärt werden, in welchem Umfang das Morphin umgesetzt wird und ob neben dem Pseudomorphin weitere Reaktionsprodukte auftreten.

Da auch bei der Oxydation mit anorganischen Oxydationsmitteln Pseudomorphin entsteht, konnte es auch bei den von E. SCHWALB durchgeführten Versuchen als Oxydationsprodukt erwartet werden. Die bisherigen Untersuchungen ließen es jedoch unwahrscheinlich sein, daß das Pseudomorphin während der Reaktion in größerer Menge anfällt. Es sollte daher besonders die Möglichkeit einer weiteren fermentativen

Umwandlung des Pseudomorphins geprüft werden, die das Fehlen größerer Mengen dieses Oxydationsproduktes erklären würde. Daß dabei das Pseudomorphin selbst als Substrat für die Phenoloxydase in Frage kommt, erscheint von vornherein unwahrscheinlich, da beide o-Stellungen zu den phenolischen Hydroxylgruppen substituiert sind, was nach den bisherigen Kenntnissen eine fermentative Oxydation durch Phenoloxydase ausschließt (8). Eher scheint die Möglichkeit einer Sekundärreaktion durch phenolische Überträgerstoffe zu bestehen, eine Frage, der unser besonderes Interesse galt.

C. Allgemeiner Teil

I. Manometrische Untersuchungen der Systeme Phenoloxydase/Morphin und Phenoloxydase/Überträger/Morphin

1. Einwirkung von Phenoloxydase auf Morphin

W. WIECHULA (30) berichtete, daß die im Mohnmilchsaft enthaltene Phenoloxydase nicht in der Lage ist, Morphin zu oxydieren. Um festzustellen, ob Phenoloxydase anderer Herkunft sich ebenso verhält, wurden manometrische Messungen und papierchromatographische Untersuchungen durchgeführt. Theoretisch war auch hier keine Oxydation durch die Phenoloxydase zu erwarten, da die Grundvoraussetzung, daß beide o-Stellungen zur phenolischen Hydroxylgruppe nicht substituiert sein dürfen, nicht erfüllt ist.

a. Kartoffel-Phenoloxydase

Die Reaktionsansätze enthielten 0,2 - 5,0 mg Morphinhydrochlorid/ml und 0,2 - 1,0 Cresolase-Einheiten Ferment/ml. Als Lösungsmittel diente m/75-Phosphatpuffer. Während einer Reaktionszeit von 12 Stunden konnte mit der Warburg-Apparatur kein Sauerstoffverbrauch gemessen werden.

b. Champignon-Phenoloxydase

Die Reaktionsansätze enthielten ähnlich wie bei den Versuchen mit der Kartoffel-Phenoloxydase 0,2 - 5,0 mg Morphinhydrochlorid/ml und 0,2 - 4,0 Cresolase-Einheiten Ferment/ml. Als Lösungsmittel diente m/75-Phosphatpuffer. Während einer Reaktionszeit von 12 Stunden konnte mit der Warburg-Apparatur kein Sauerstoffverbrauch gemessen werden.

Papierchromatographische Untersuchungen der Reaktionslösungen vor und nach der Fermenteinwirkung ließen keine Reaktionsprodukte erkennen.

Durch diese Versuche wurde gezeigt, daß keine Unterschiede im Verhalten der Phenoloxydase aus Kartoffeln, Champignons und Mohnmilchsaft im System Phenoloxydase/Morphin

bestehen; eine Oxydation des Morphins durch die Phenoloxidasen verschiedener Herkunft ist nicht möglich.

2. Einwirkung von Phenoloxydase auf p-Cumarsäure und p-Cumarsäure/Morphin

E. SCHWALB (31) berichtet, daß bei Anwesenheit des phenolischen Überträgers p-Cumarsäure Morphin von der Phenoloxydase umgesetzt wird. Die Frage, ob es sich dabei vielleicht um eine Oxydation des Morphins durch ein entstehendes Chinon oder um eine Verbindung des Morphins mit einem Oxydationsprodukt der p-Cumarsäure handelt, blieb offen.

Um einen besseren Einblick in die Reaktion zu gewinnen, erschien es wichtig, das System auch auf manometrischem Wege zu untersuchen. E. SCHWALB (31) hatte das Morphin photometrisch nach papierchromatographischer Abtrennung bestimmt und eine maximale Morphinabnahme von 15,2% innerhalb von 18 Stunden festgestellt. Dieser Wert wurde bei einer Konzentration von 0,5 mg p-Cumarsäure/ml Reaktionslösung erzielt. Die Morphinabnahme in dem System Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Morphin war außer von der Konzentration der p-Cumarsäure auch von der Fermentkonzentration abhängig.

Da die Phenoloxydase p-Cumarsäure nur langsam angreift, ist es erforderlich, die Fermentkonzentration im Vergleich zu anderen Systemen (Phenoloxydase/Kaffeensäure/Morphin) zu erhöhen und den Beobachtungszeitraum entsprechend zu verlängern. Für die Warburg-Messungen wurden deshalb eine p-Cumarsäurekonzentration von 0,5 mg/ml Reaktionslösung und eine Fermentkonzentration von 0,8 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung gewählt. Morphinhydrochlorid wurde in Mengen von 1,0 - 5,0 mg/ml Reaktionslösung zugesetzt.

a. Kartoffel-Phenoloxydase

Wie aus Abb.1 ersichtlich ist, bewirkt der Zusatz verschiedener Morphinmengen zu Phenoloxydase/p-Cumarsäure einen mit zunehmender Morphinkonzentration steigenden Sauerstoffverbrauch. Darüber hinaus zeigt sich eine deutliche Verkürzung der Induktionszeit bei zunehmender Morphinkonzentration. Messungen mit einer wesentlich geringeren p-Cu-

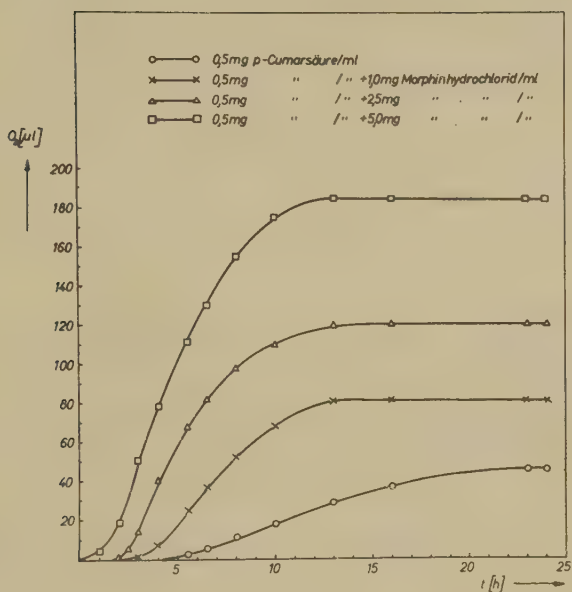


Abb.1: Oxydation von p-Cumarsäure und p-Cumarsäure/Morphin durch Phenoloxydase (0,8 Cresolase-Einheiten Kartoffel-Phenoloxydase/ml Reaktionslösung)

arsäurekonzentration als der von E. SCHWALB für die maximale Morphinabnahme ermittelten ergaben ebenfalls einen vermehrten Sauerstoffverbrauch und eine Verkürzung der Induktionszeit bei Morphinzusatz (s. Abb. 2). An diesen Aussagen ändert sich nichts, wenn die Fermentkonzentration erhöht wird (2,4 Cresolase-Einheiten Kartoffel-Phenoloxydase/ml Reaktionslösung). Bei einem geringeren Morphinzusatz als 200 γ Morphinhydrochlorid/ml Reaktionslösung lag der Sauerstoffmehrverbrauch nur noch innerhalb der Fehlerbreite der Meßanordnung.

Eine Sekundärreaktion der Oxydationsprodukte der p-Cumarsäure (3,4-Dioxozimtsäure) mit dem Morphin scheint also hier sicher zu sein. Da diese Sekundärreaktion mit einem

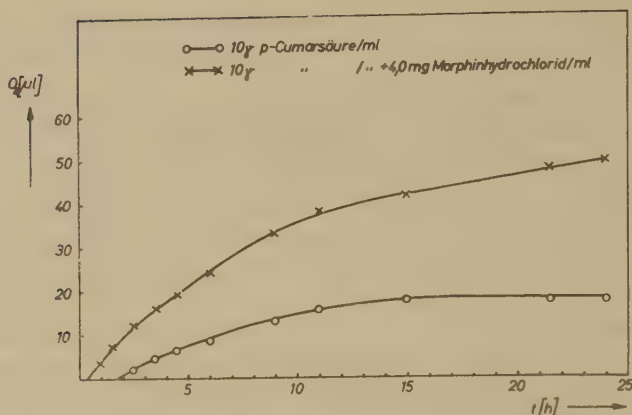
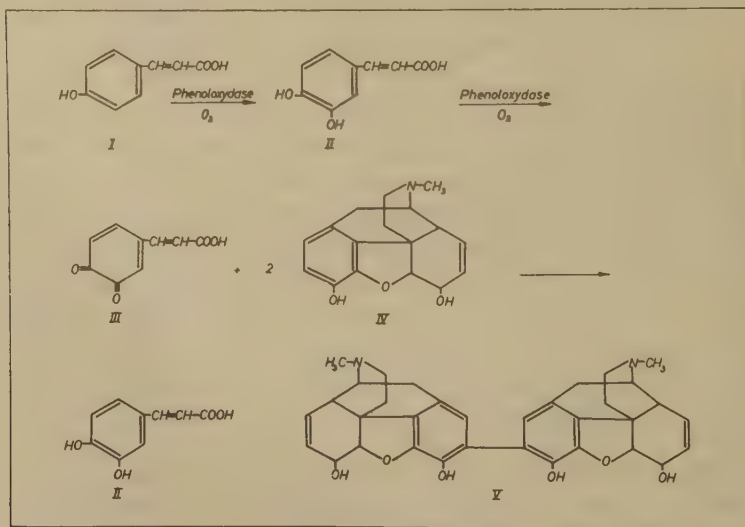


Abb. 2: Oxydation von p-Cumarsäure und p-Cumarsäure/Morphin durch Phenoloxydase (0,8 Cresolase-Einheiten Kartoffel-Phenoloxydase/ml Reaktionslösung)

Sauerstoffverbrauch verbunden ist, sollte man eine Oxydation des Morphin zu Pseudomorphin erwarten müssen, was einer Überträgerreaktion im Sinne von F. KUBOWITZ entsprechen würde (34, 35). Die Reaktion müßte dann nach folgendem Schema verlaufen:



In einem ersten Reaktionsschritt wird die p-Cumarsäure (I) durch Phenoloxydase in o-Stellung zur Hydroxylgruppe hydroxyliert. Die resultierende 3,4-Dihydroxyzimtsäure (II) wird durch das Ferment zur 3,4-Dioxyzimtsäure (III) dehydriert, welche wiederum zwei Moleküle Morphin (IV) zu Pseudomorphin (V) auf nichtenzymatischem Wege oxydiert unter Rückbildung von 3,4-Dihydroxyzimtsäure (II). Daraus geht hervor, daß 3,4-Dihydroxyzimtsäure im System vorhanden sein muß, solange noch Morphin, das als Redukton wirkt, vorliegt.

Auf papierchromatographischem Wege wurde versucht, die 3,4-Dihydroxyzimtsäure nachzuweisen. Es wurden jeweils 0,5 ml Reaktionsansatz (vgl.S.15), der pro ml 0,5 mg p-Cumarsäure und 2,5 mg Morphinhydrochlorid enthielt, chromatographiert. Auf dem Papierchromatogramm einer Probe zur Reaktionszeit $t = 0$ waren lediglich Morphin ($R_F = 0,44$) und p-Cumarsäure ($R_F = 0,89$) sichtbar. Nach einer Reaktionszeit von 6 Stunden war unter der UV-Lampe außer Morphin und p-Cumarsäure bei $R_F = 0,81$ eine hellblaue Fluoreszenz zu erkennen, die der erwarteten 3,4-Dihydroxyzimtsäure zukommt, wie durch entsprechende Vergleichsproben sichergestellt wurde. Die bei diesen Versuchen festgestellten R_F -Werte liegen unter den sonst für das Fließmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) angegebenen, was erfahrungsgemäß durch den Einfluß der aufgetragenen wäßrigen Pufferlösung bedingt ist.

In unserem Arbeitskreis konnte inzwischen H.-G. SCHNELLER (39) Pseudomorphin als Oxydationsprodukt des Morphins im System Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Morphin nachweisen; die auftretende Pseudomorphinmenge war allerdings dem Morphinverlust nicht aliquot. Diese Tatsache berechtigt zu der Annahme, daß Pseudomorphin nicht das Endprodukt dieser Reaktion ist, sondern eventuell auf Grund seines phenolischen Charakters weiter umgesetzt wird.

b. Champignon-Phenoloxydase

Die vorstehend beschriebenen manometrischen Messungen wurden mit Champignon-Phenoloxydase statt Kartoffel-Phenoloxydase wiederholt.

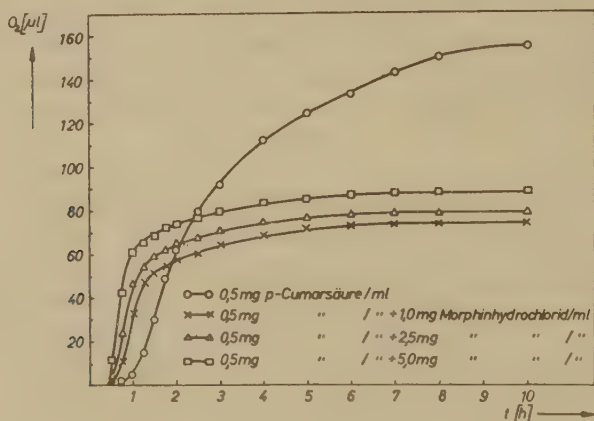


Abb. 3: Oxydation von p-Cumarsäure und p-Cumarsäure/Morphin durch Phenoloxydase (0,8 Cresolase-Einheiten Champignon-Phenoloxydase/ml Reaktionslösung)

Der Reaktionsansatz entspricht dem in Abb. 1 dargestellten. Trotzdem bestehen in den Reaktionsabläufen deutliche, wenn auch, wie noch zu begründen ist, keine prinzipiellen Unterschiede. In beiden Fällen ist durch den Zusatz von Morphin eine Verkürzung der Induktionszeit festzustellen, die allerdings bei der Champignon-Phenoloxydase wesentlich kürzer ist. Auch die maximale Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit wird in beiden Reaktionsansätzen mit steigendem Morphinzusatz erhöht. Die Champignon-Phenoloxydase zeigt aber ein von der aus der Kartoffel gewonnenen Fermentpräparation abweichendes Verhalten insofern, als schon nach einer Stunde Reaktionszeit eine durch den Morphinzusatz ausgelöste rasch zunehmende Inaktivierung eintritt, so daß nach 2,5 Stunden der Sauerstoffverbrauch der Morphin enthaltenden Ansätze geringer ist als der desjenigen Versuchsansatzes,

der p-Cumarsäure als alleiniges Substrat enthält. Dennoch dürfte auch in diesem Fall die Reaktion dem auf Seite 16 gegebenen Schema entsprechen. Die in der ersten Stunde durch den Morphinzusatz bewirkte vermehrte Sauerstoffaufnahme des Systems Champignon-Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Morphin ist nur durch eine Überträgerwirkung zu erklären, da ja Morphin in Abwesenheit der p-Cumarsäure keinen Sauerstoffverbrauch zur Folge hätte.

3. Einwirkung von Phenoloxydase auf Kaffeesäure und Kaffeesäure/Morphin

Auch in diesem System wurde von E. SCHWALB (31) eine Abnahme des Morphins festgestellt. Eine maximale Morphinabnahme beobachtete er bei einer Kaffeesäurekonzentration von 0,4 mg/ml Reaktionslösung und einer Morphinkonzentration von 4,0 mg Morphinhydrochlorid/ml Reaktionslösung. Die Konzentrationen der folgenden manometrischen Untersuchungen wurden deshalb entsprechend gewählt.

a. Kartoffel-Phenoloxydase

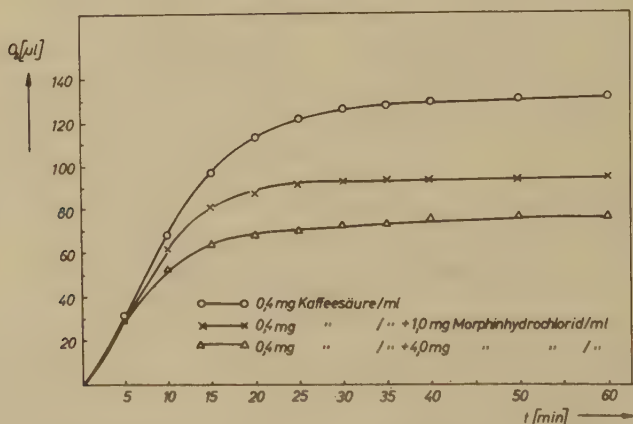


Abb. 4: Oxydation von Kaffeesäure und Kaffeesäure/Morphin durch Phenoloxydase (0,24 Cresolase-Einheiten Kartoffel-Phenoloxydase/ml Reaktionslösung)

Im Gegensatz zum System Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Morphin setzt hier die Reaktion spontan ein und kommt schon nach 40 Minuten durch eine zunehmende Inaktivierung des Fermentes zum Stillstand. Bis zu einer Konzentration von 0,4 mg Morphinhydrochlorid/ml Reaktionslösung wirkt sich ein Morphinzusatz nicht auf den Sauerstoffverbrauch eines Reaktionsansatzes mit 0,4 mg Kaffeesäure/ml aus, darüber hinaus nimmt der Sauerstoffverbrauch mit steigender Morphinkon-

zentration ab (s. Abb.4). Eine Verringerung der Fermentkonzentration (0,12 Cresolase-Einheiten/ml) führt zu keinen anderen Aussagen.

b. Champignon-Phenoloxydase

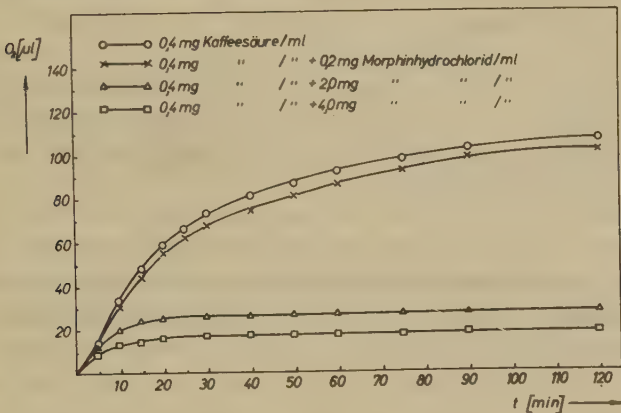


Abb.5: Oxydation von Kaffeesäure und Kaffeesäure/Morphin durch Phenoloxydase (0,24 Cresolase-Einheiten Champignon-Phenoloxydase/ml Reaktionslösung)

Bei Verwendung von Champignon-Phenoloxydase ist kein prinzipieller Unterschied im Verhalten zu der aus Kartoffeln gewonnenen Fermentpräparation festzustellen, wie aus den in Abb.4 und 5 dargestellten Reaktionen hervorgeht. Allerdings ist die Verringerung des Sauerstoffverbrauchs durch den gleichen Morphinzusatz bei der Champignon-Phenoloxydase größer. Bei Zugabe von 0,2 mg Morphinhydrochlorid wird eine, wenn auch geringe, Abnahme des Sauerstoffverbrauchs sichtbar; sie liegt aber noch innerhalb der Fehlerbreite der Meßanordnung.

Die Reduzierung des Sauerstoffverbrauchs durch Zusatz von Morphin bei gleichbleibender Kaffeesäurekonzentration widerspricht einer Überträgerwirkung und damit einer Oxydation des Morphins, wenn auch nicht auszuschließen ist, daß

eine schwächere Oxydation durch eine stärkere Hemmwirkung überdeckt wird. Aus dem Verlauf der Kurven (Abb.4 und 5) muß auf eine Hemmung geschlossen werden. Eine zunehmende Inaktivierung durch Morphin scheint dabei nicht in Frage zu kommen, denn bei Zusatz von Morphin zu Phenoloxydase/p-Cresol (31) oder zu Phenoloxydase/p-Cumarsäure tritt keine derartige Hemmung auf. E. KEESE (40, 41) stellte ebenfalls nur eine geringe Empfindlichkeit der Phenoloxydase gegen Morphin fest. Die Hemmwirkung muß demnach nicht auf Morphin, sondern eine während der Reaktion entstehende Verbindung zurückzuführen sein, die bei Abwesenheit des Morphins nicht gebildet wird.

Es wurde versucht festzustellen, ob innerhalb der ersten Minuten des Reaktionsablaufes ein durch den Morphinzusatz bewirkter Sauerstoffmehrverbrauch gegenüber dem System Ferment/Kaffeensäure zu messen ist. Das würde ein Kurvenbild, wie in Abb.3 für das System Champignon-Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Morphin dargestellt, ergeben und dafür sprechen, daß die Reaktion im System Ferment/Kaffeensäure/Morphin ebenfalls nach dem auf Seite 16 beschriebenen Schema abläuft. Da aber gerade die ersten 5 Minuten bei einer manometrisch verfolgten Reaktion mit dem größten Meßfehler behaftet sind, ließ sich aus den erhaltenen Meßwerten, die bei Morphinzusatz (4,0 mg/ml) während der ersten 4 Minuten geringfügig höher lagen, keine sichere Aussage machen.

Papierchromatographische Untersuchungen von 0,2 ml Reaktionsansatz mit 4,0 mg Morphinhydrochlorid/ml (s.S. 20) zur Reaktionszeit $t = 0$ lassen bei Betrachtung unter der UV-Lampe und nach dem Besprühen mit Alkaloid- und Phenolreagenz lediglich Morphin ($R_F = 0,47$) und Kaffeensäure ($R_F = 0,84$) erkennen. Nach einer Reaktionszeit von 90 Minuten werden zwei weitere Substanzen auf dem Chromatogramm sichtbar ($R_F = 0,11$ und $R_F = 0,72$). Die beim $R_F = 0,11$ lokalisierte Substanz liegt nur in sehr geringer Konzentration vor und läßt sich durch Besprühen mit Alkaloidreagenz anfärben, dagegen nicht mit Paulys Reagenz (42); der R_F -Wert

entspricht dem des Pseudomorphins, jedoch konnte die für das Pseudomorphin charakteristische hellblaue Fluoreszenz im UV-Licht nicht festgestellt werden. Es dürfte sich demnach um ein nichtphenolisches Alkaloid handeln. Die beim $R_F = 0,72$ im UV-Licht durch eine schwache blaßgrüne Fluoreszenz sichtbare Verbindung gibt weder eine Alkaloid- noch eine Phenolreaktion.

Das Fehlen von Pseudomorphin als Reaktionsprodukt spricht zunächst gegen eine Überträgerwirkung der Kaffeesäure im System Phenoloxydase/Kaffeesäure/Morphin. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß Pseudomorphin im Laufe der Reaktion zwar entsteht, aber unter dem Einfluß von Phenoloxydase/Kaffeesäure weiter umgesetzt wird, weshalb Untersuchungen mit dem System Phenoloxydase/Kaffeesäure/Pseudomorphin angestellt werden (s.S. 39).

II. Untersuchungen zum Verhalten von Morphin und Pseudomorphin bei Einwirkung von Wasserstoffperoxid/Peroxydase

1. Einwirkung von Wasserstoffperoxid/Peroxydase auf Morphin

R. FIRBAS (43) berichtete schon 1905 über die Möglichkeit einer Pseudomorphindarstellung aus Morphin durch Einwirkung von Gummi arabicum, das Oxydasen und Peroxydasen enthält. Eine mögliche Erklärung dieser Reaktion gab K.-H. FRÖMMING (8), der bei papierchromatographischen in-vitro-Untersuchungen feststellte, daß durch Wasserstoffperoxid-Peroxydase aus Morphin Pseudomorphin gebildet wird. Dagegen kann Phenoloxydase für diese Oxydation nicht verantwortlich sein. Mit den folgenden Versuchen sollte festgestellt werden, in welchem Maße das Morphin durch H_2O_2 -Peroxydase angegriffen wird und ob neben dem Pseudomorphin andere alkaloidische Reaktionsprodukte entstehen. Da die Untersuchungen in erster Linie spektralphotometrisch vorgenommen werden sollten, wurden zunächst Spektren äquivalenter Men-

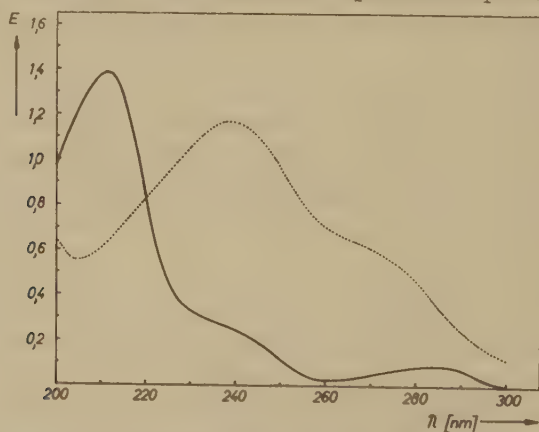


Abb. 6: Spektren äquivalenter Mengen Morphin und Pseudomorphin

— 2,25 mg Morphinhydrochlorid ($= 6 \cdot 10^{-6}$ Mol)/100,0 ml
m/30-Phosphatpuffer pH 6,0

..... 1,87 mg Pseudomorphin ($= 3 \cdot 10^{-6}$ Mol)/100,0 ml
m/30-Phosphatpuffer pH 6,0

gen Morphin und Pseudomorphin aufgenommen (s.Abb.6). Als Lösungsmittel wurde m/30-Phosphatpuffer pH 6,0 gewählt, da die Fermentreaktion im gleichen Milieu verfolgt werden sollte.

Aus dem Verlauf der Spektren wird erkenntlich, welche Veränderungen das Morphinspektrum bei einer teilweisen oder vollständigen Oxydation zu Pseudomorphin durch H_2O_2 -Peroxydase erleiden müßte. Im Bereich von 200 - 220 nm wäre eine Abnahme, im Bereich von 220 - 300 nm dagegen eine Zunahme der Extinktion zu erwarten.

Reaktionsansatz:

2,25 mg Morphinhydrochlorid ($= 6 \cdot 10^{-6}$ Mol)

0,30 ml m/10-Wasserstoffperoxidlösung ($= 3 \cdot 10^{-5}$ Mol)

0,50 mg Peroxydase

m/30-Phosphatpuffer pH 6,0 zu 100,0 ml

Das Spektrum der Reaktionslösung wurde in größeren Zeitabständen gegen eine Vergleichslösung, die sich vom Reaktionsansatz nur durch das Fehlen des Morphins unterschied, gemessen. (s.Abb.7)

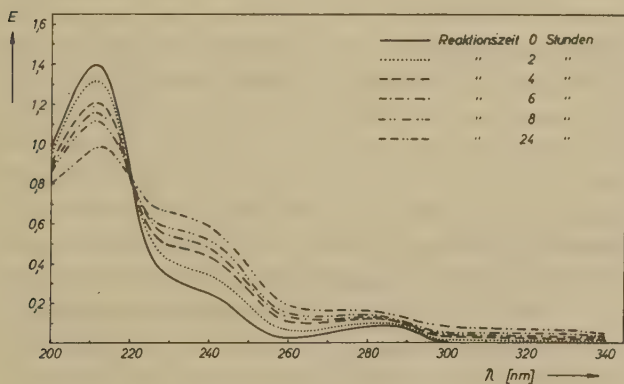


Abb.7: Oxydation von Morphin durch H_2O_2 -Peroxydase

Die Änderung des Morphinspektrums läßt eine schrittweise Angleichung an das Pseudomorphinspektrum erkennen. Wie erwartet nimmt die Extinktion im Bereich von 200 - 220 nm ab und oberhalb 220 nm zu. Die größte Abnahme tritt bei 211 nm, dem Maximum des Morphinspektrums, die größte Zunahme dagegen zwischen 230 und 240 nm, wo das Maximum des Pseudomorphinspektrums liegt (237 nm), auf. Bei 220 nm, dem Schnittpunkt der beiden Spektren, schwankten die gemessenen Extinktionen im Verlauf der Reaktion um nicht mehr als 1%. Das spricht für das Vorliegen eines isosbestischen Punktes und macht wahrscheinlich, daß während der Umsetzung des Morphins nur ein Folgeprodukt entsteht oder daß beim Auftreten mehrerer Reaktionsprodukte diese annähernd gleiche Lichtabsorptionswerte bei 220 nm aufweisen müssen. Daß letzteres der Fall ist, zeigen die Versuche mit Wasserstoffperoxid-Peroxydase-Pseudomorphin.

Da trotz dieser Ergebnisse die Bildung von Pseudomorphin nicht ausreichend bewiesen ist, wurden papierchromatographische Untersuchungen durchgeführt. Diese ergaben eindeutig die Anwesenheit von Pseudomorphin, das bei $R_F = 0,22$ durch eine hellblaue Fluoreszenz im UV-Licht und eine blauviolette Färbung nach dem Besprühen mit Alkaloidreagenz leicht zu erkennen war. Für diese Untersuchung wurde 1,0 ml des Reaktionsansatzes (Reaktionszeit 24 Stunden) aufgetragen. Unter den angegebenen Bedingungen waren außer Pseudomorphin keine weiteren alkaloidischen Reaktionsprodukte nachzuweisen.

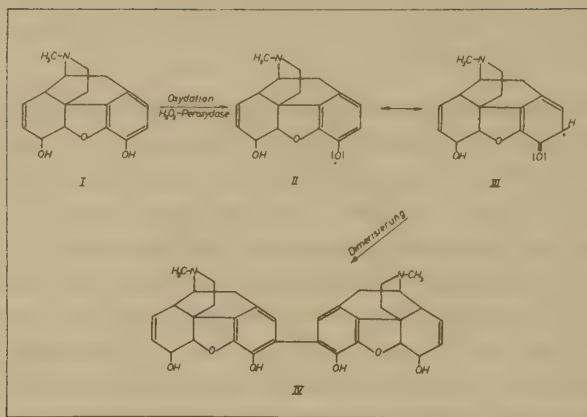
Vorausgesetzt, daß die Oxydation des Morphins durch Wasserstoffperoxid-Peroxydase ausschließlich zu Pseudomorphin erfolgen würde, läßt sich die Morphinabnahme in vom Hundert der zur Reaktionszeit $t = 0$ vorhandenen Morphinmenge berechnen. Die Berechnung der umgesetzten Morphinmenge erfolgte aus den in Abb.7 angegebenen Extinktionen bei 260 nm, da bei dieser Wellenlänge der relative Unterschied der Extinktionen von Pseudomorphin und Morphin am größten ist. Die Morphinabnahme beträgt 6% nach 2 Stunden, 12% nach 4 Stunden und 25% nach 24 Stunden Reaktionszeit.

Wie aber die später beschriebenen Versuche mit H_2O_2 -Peroxidase-Pseudomorphin zeigen, dürften die tatsächlichen Morphinverluste größer sein.

Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß die Morphinabnahme nicht fermentativ durch H_2O_2 -Peroxidase, sondern durch autoxydative Veränderungen oder den Einfluß des Wasserstoffperoxids allein bedingt ist. Deshalb wurden die Veränderungen des Morphinspektrums in einem Reaktionsansatz, der sich von dem auf Seite 25 beschriebenen nur durch das Fehlen der Peroxidase unterschied, geprüft. Innerhalb von 24 Stunden waren die Abweichungen der aufgenommenen Spektren so gering, daß sie vernachlässigt werden konnten.

Ein zweiter Kontrollversuch sollte den Einfluß der Peroxidase beim Fehlen von Wasserstoffperoxid klären. Dazu wurden entsprechende Messungen mit einem Reaktionsansatz durchgeführt, dem gegenüber dem auf Seite 25 beschriebenen die Wasserstoffperoxidlösung fehlte. Auch hierbei konnte auf keine Veränderung des Morphins geschlossen werden. Geringe Abweichungen, die innerhalb zu tolerierender Grenzen lagen, traten bei den zu den Reaktionszeiten 0, 6 und 24 Stunden gemessenen Spektren nur im Bereich von 200 - 220 nm ein.

Somit dürfte sicher sein, daß das Morphin durch eine fermentkatalysierte Reaktion zu Pseudomorphin oxydiert wird, die folgendermaßen ablaufen dürfte: Das Morphin (I) wird durch Wasserstoffperoxid-Peroxidase in einer Ein-Elektron-Reaktion oxydiert, was zur Bildung mesomerer Radikale (II, III) führt. Eine Stabilisierung des primär entstehenden Phenoxyldradikals (II) wird über das C-Radikal (III) durch Dimerisierung zu Pseudomorphin (IV) unter Rückbildung der aromatischen Struktur erreicht.



2. Einwirkung von Wasserstoffperoxid/Peroxydase auf Pseudomorphin

Wie durch spektralphotometrische und papierchromatographische Untersuchungen gezeigt werden konnte, entsteht Pseudomorphin bei der Oxydation des Morphins durch H_2O_2 -Peroxydase. Es sollte geklärt werden, ob Pseudomorphin dabei ein stabiles Endprodukt darstellt, oder ob es durch H_2O_2 -Peroxydase weiter oxydiert werden kann. Bei einer weiteren Umsetzung müßte diese Reaktion allerdings mit einer wesentlich geringeren Reaktionsgeschwindigkeit ablaufen als die durch das Fermentsystem katalysierte Oxydation des Morphins zum Pseudomorphin; andernfalls hätte das Pseudomorphin in diesen Reaktionsansätzen nicht gefunden werden können.

Reaktionsansatz:

1,40 mg Pseudomorphin ($= 2,25 \cdot 10^{-6}$ Mol)

0,30 ml m/10-Wasserstoffperoxidlösung ($= 3 \cdot 10^{-5}$ Mol)

0,50 mg Peroxydase

m/30-Phosphatpuffer pH 6,0 zu 100,0 ml

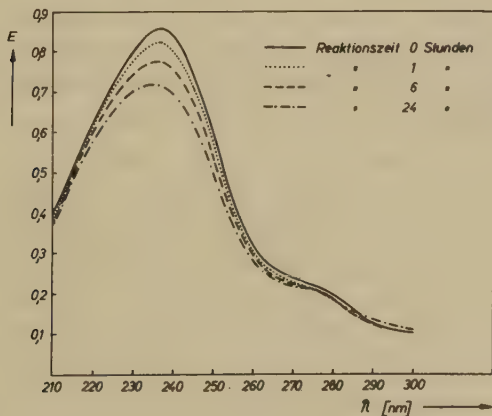


Abb.8: Einwirkung von H_2O_2 -Peroxydase auf Pseudomorphin

Zu den Reaktionszeiten 0, 1, 6 und 24 Stunden wurde das Spektrum der Reaktionslösung gegen eine Vergleichslösung, die kein Pseudomorphin enthielt, aufgenommen (s. Abb. 8).

Wie aus den Meßwerten hervorgeht, nimmt mit zunehmender Reaktionszeit im Bereich von 220 - 260 nm die Extinktion ab, so daß auf eine Umsetzung des Pseudomorphins geschlossen werden muß. Kontrollversuche, die entweder keine Wasserstoffperoxidlösung oder keine Peroxydase enthielten, zeigten keine Veränderung des Pseudomorphinspektrums.

Wenn die Oxydation des Morphins durch H_2O_2 -Peroxydase über das Pseudomorphin hinausführt, worauf die in Abb. 8 fixierten Meßwerte schließen lassen, so sind die Änderungen des Morphinspektrums (s. Abb. 7) nicht allein auf die Pseudomorphinbildung zurückzuführen, und eine Berechnung der Morphinabnahme aus der Extinktionsänderung ist nicht mehr möglich. Da die Extinktionen bei der Oxydation des Morphins zum Pseudomorphin im Bereich von 220 - 260 nm zunehmen, bei einer weiteren Reaktion des Pseudomorphins aber abnehmen, liegt die tatsächliche Morphinabnahme über den errechneten Werten.

Bei 220 nm ist, wie aus Abb. 8 hervorgeht, die Extinktionsänderung relativ gering, so daß die Annahme eines isosbestischen Punktes bei dieser Wellenlänge für die durch Wasserstoffperoxid-Peroxydase katalysierte Oxydation des Morphins zu Pseudomorphin erklärlich wird.

III. Untersuchungen zum Verhalten von Pseudomorphin in den Systemen Phenoloxydase/Pseudomorphin und Phenoloxydase/Überträger/Pseudomorphin

1. Kolorimetrische Bestimmung von Pseudomorphin

Wegen der außerordentlich geringen Löslichkeit des Pseudomorphins in wäßrigen Pufferlösungen bei pH 5-7 ist eine Beobachtung der Reaktion des Alkaloids mit Phenoloxydase in der Warburg-Apparatur nicht möglich. Das zur Oxydation der geringen gelösten Menge Pseudomorphin verbrauchte Sauerstoffvolumen würde die Empfindlichkeit der manometrischen Methode übersteigen.

Die Frage, ob die Phenoloxydase in der Lage ist, Pseudomorphin zu oxydieren, mußte also auf anderem Wege geklärt werden. Pseudomorphin gibt mit zahlreichen Aldehyden Farbreaktionen (44), die teilweise zur quantitativen Bestimmung des Pseudomorphins verwendbar sind. Im vorliegenden Falle schien die Bestimmung nach A.N. THORN und A. AGREN (44) geeignet, wobei das Alkaloid eine Grünfärbung mit Vanillin-Schwefelsäure gibt; die Bestimmung des Pseudomorphins ist mit dieser Methode neben Morphin möglich.

Nach der von A.N. THORN und A. AGREN gegebenen Vorschrift konnte keine exakte Eichgerade aufgestellt werden, deshalb wurde die Methode in einigen Punkten geändert. Zunächst wurde das Spektrum des Farbstoffs aufgenommen. Dazu wurde das Pseudomorphin in m/75-Phosphatpuffer pH 6,0 gelöst, da alle späteren Fermentreaktionen ebenfalls in diesem Lösungsmittel vorgenommen werden. Reagenz- und Pseudomorphinlösung werden 30 Minuten im Eisbad gekühlt. In einem großen Reagenzglas, das sich im Eisbad befindet, werden 25,0 ml Vanillin-Schwefelsäure mit 1,25 ml Pseudomorphinlösung vorsichtig überschichtet. Nach 10 Minuten werden Pseudomorphinlösung und Reagenz durch Einblasen von Luft mittels einer trockenen Pipette gemischt, nach weiteren 10 Minuten die Proben dem Eisbad entnommen und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann 20

Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und 40 Minuten nach der Entnahme aus dem Wasserbad das Spektrum gegen eine Vergleichslösung, der lediglich das Pseudomorphin fehlt, gemessen (2 cm-Glasküvetten) (s. Abb. 9).

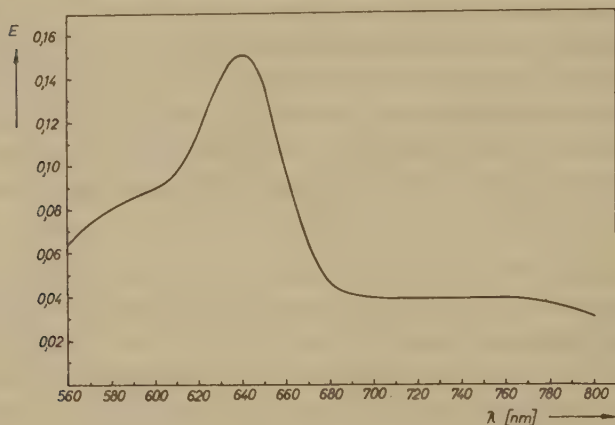


Abb. 9: Spektrum des Farbstoffs der Pseudomorphin-Vanillin-Reaktion

62,5 γ Pseudomorphin/1,25 ml m/75-Phosphatpuffer
pH 6,0 + 25,0 ml Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz

Das Spektrum des Farbstoffs zeigt ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 640 nm: diese Angabe deckt sich mit der von E.G. GUNDERSEN und J. MØRCH (11), während A.N. THORN und A. AGREN (44) das Maximum bei 600 nm fanden.

Um festzustellen, wann die maximale Farbintensität nach der Entnahme aus dem Wasserbad erreicht ist, wurde die Extinktion bei 640 nm über einen längeren Zeitraum gemessen. Sie blieb innerhalb geringer zu vernachlässigender Schwankungen über eine Zeit von 2,5 Stunden konstant. Angaben über den Einfluß der Erhitzungsdauer, der Schwefelsäure- und Vanillinkonzentration auf die Farbentwicklung werden von A.N. THORN und A. AGREN gemacht (44).

Zur Aufstellung der Eichgeraden (Abb.10) für die quantitative Pseudomorphinbestimmung wurde eine Pseudomorphinlösung mit einer Konzentration von 70γ/ml m/75-Phosphatpuffer mehrfach mit Pufferlösung verdünnt und die Farb-reaktion nach der oben angegebenen Vorschrift durchgeführt. 40 Minuten nach der Entnahme aus dem Wasserbad wurde die Extinktion gegen eine Blindprobe ohne Pseudomorphin mit einem Photometer gemessen. Die für die Aufstellung der Eichgeraden verwendeten Werte sind Mittelwerte aus jeweils 5 Bestimmungen.

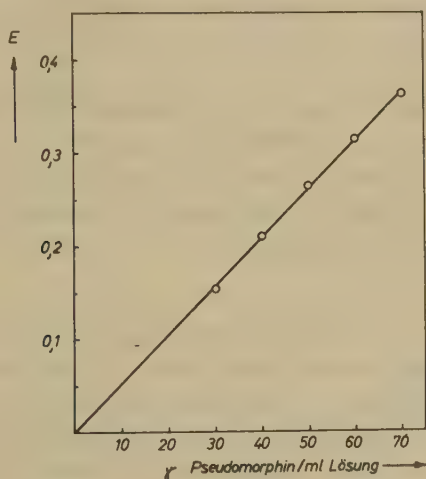


Abb.10: Eichgerade der Pseudomorphinbestimmung

Eine Erhöhung der Pseudomorphinkonzentration über 70γ/ml Lösung hinaus ist nicht möglich, da bei dieser Konzentration die Löslichkeitsgrenze erreicht wird. Die Pseudomorphinkonzentration aller später beschriebenen Versuche liegt innerhalb dieser Grenze, so daß für eine weitergehende Untersuchung keine Notwendigkeit besteht. Die Farb-reaktion folgt dem Lambert-Beerschen-Gesetz für die Konzentrationen von 0-70γ Pseudomorphin/ml.

2. Einwirkung von Phenoloxydase auf Pseudomorphin

Mit Hilfe der photometrischen Bestimmungsmethode sollte geklärt werden, ob durch die Einwirkung der Phenoloxydase eine Änderung des Pseudomorphingehaltes in der Reaktionslösung eintritt. Daneben wurde die Reaktion papierchromatographisch verfolgt.

Reaktionsansatz:

6,3 mg Pseudomorphin

60,0 mg Kartoffel-Phenoloxydase (entsprechend 2,4 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung)

m/75-Phosphatpuffer pH 6,0 zu 100,0 ml

Von der im Thermostat auf 25,0°C temperierten Lösung wurden nach 0, 1, 3, 5, 10 und 24 Stunden jeweils drei Proben von 1,25 ml entnommen und der Pseudomorphingehalt ermittelt (s.Tab.1). Als Blindlösung diente eine Lösung von 60,0 mg Kartoffel-Phenoloxydase in 100,0 ml m/75-Phosphatpuffer.

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, bleibt der Pseudomorphingehalt der Reaktionslösung konstant; die geringen Änderungen nach 24 Stunden dürften nicht mehr auf fermentative Einflüsse zurückzuführen sein. Eine Abnahme des Alkaloidgehaltes war auch theoretisch nicht zu erwarten, da im Pseudomorphinmolekül eine wesentliche Voraussetzung zur Oxydierbarkeit durch Phenoloxydase nicht erfüllt ist. (vgl.S.11).

Auch die papierchromatographischen Untersuchungen ließen keine Abnahme des Pseudomorphins erkennen. Es wurden 0,5 ml Reaktionslösung zu Beginn der Reaktion und nach 24 Stunden Reaktionszeit chromatographiert. Bei Betrachtung im UV-Licht und nach Sichtbarmachung mit Alkaloidreagenz erschienen die Alkaloidflecke unverändert.

Tabelle 1: Der Pseudomorphingehalt (ausgedrückt als Extinktion) während der Einwirkung von Phenol-oxydase

t [h]	E	E (Mittelwert)	$(E_t - E_{t=0}) \cdot 10^3$
0	0,310 0,313 0,302	0,308	
1	0,309 0,312 0,301	0,307	- 1
3	0,307 0,311 0,307	0,308	± 0
5	0,305 0,306 0,313	0,308	± 0
10	0,309 0,301 0,305	0,305	- 3
24	0,305 0,296 0,299	0,300	- 8

3. Einwirkung von Phenoloxydase auf p-Cumarsäure/Pseudomorphin

Es sollte geprüft werden, ob unter den von E. SCHWALB für das System Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Morphin angegebenen Bedingungen der maximalen Morphinabnahme eine Umsetzung des dabei gebildeten Pseudomorphins möglich ist. Die Beobachtung der Veränderung des Pseudomorphins durch Phenoloxydase/p-Cumarsäure erfolgte analog dem auf Seite 34 für das System Phenoloxydase/Pseudomorphin beschriebenen Wege. Der Eigenart der Reaktion Phenoloxydase/p-Cumarsäure (s.S.14) entsprechend wurde hier wieder die Reaktionszeit auf 20 Stunden ausgedehnt und eine Fermentkonzentration von 0,8 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung gewählt.

Reaktionsansatz:

10,0 mg p-Cumarsäure/10,0 ml m/30-Phosphatpuffer pH 6,0
1,12 mg Pseudomorphin/12,5 ml Wasser
5,0 mg Kartoffel-Phenoloxydase/2,5 ml Wasser

Konzentrationen pro ml Reaktionslösung:

0,4 mg p-Cumarsäure; 45 γ Pseudomorphin; 0,8 Cresolase-Einheiten Phenoloxydase.

Zunächst wurden die p-Cumarsäure- und Pseudomorphinlösung in einem Erlenmeyerkolben gemischt und dieser, wie auch die Fermentlösung, 20 Minuten auf 25,0°C temperiert. Dann wurde die Fermentlösung in den Kolben gegeben. Die Entnahme der Proben zur Bestimmung des Pseudomorphingehaltes erfolgte erst in zweistündigem, später in vierstündigem Abstand. Als Blindlösung diente eine Lösung, der gegenüber dem Reaktionsansatz das Pseudomorphin fehlte. Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, nimmt der Pseudomorphingehalt über die Beobachtungszeit laufend ab; nach 20 Stunden wurde photometrisch nur eine Restmenge von ca. 13% des Ausgangswertes gefunden.

Tabelle 2: Der Pseudomorphingehalt (ausgedrückt als Extinktion) während der Einwirkung von Phenol-oxydase/p-Cumarsäure

t [h]	E	E (Mittelwert)	$(E_t - E_{t=0}) \cdot 10^3$
0	0,249 0,231 0,234 0,238	0,238	
2	0,237 0,241 0,234 0,236	0,236	- 2
4	0,220 0,230 0,234 0,233	0,229	- 9
8	0,210 0,219 0,209 0,221	0,215	- 23
12	0,125 0,129 0,121 0,124	0,125	- 113
16	0,078 0,062 0,077 0,091	0,077	- 161
20	0,021 0,027 0,043 0,029	0,030	- 208

Zur Kontrolle dieser Meßwerte wurden papierchromatographische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde 1,0 ml Reaktionslösung (= 45 γ Pseudomorphin), in der das Ferment durch kurzes Aufkochen inhihibiert worden war, außerdem 1,0 ml Reaktionslösung nach 20-stündiger Reaktion und 5, 10, 20 und 45 γ Pseudomorphin aufgetragen. Dann wurde entwickelt und mit Alkaloidreagenz besprüht. Während die Fleckengröße und Farbintensität des Ausgangswertes mit dem Vergleichsfleck von 45 γ Pseudomorphin übereinstimmte, war nach 20-stündiger Reaktionszeit der Pseudomorphinfleck kleiner als der von 5 γ Pseudomorphin, was einer Restmenge von annähernd 5-10% Pseudomorphin entspricht, so daß eine gute Übereinstimmung mit dem in Tabelle 2 angegebenen Wert besteht.

Während eine Oxydation des Pseudomorphins durch Phenoloxydase allein nicht möglich ist, erfolgt durch Phenoloxydase/p-Cumarsäure eine 90%ige Umsetzung des Pseudomorphins unter den angegebenen Bedingungen. Das wäre eine Erklärung für die Tatsache, daß in den von E. SCHWALB beschriebenen Ansätzen des Systems Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Morphin das Pseudomorphin von H.-G. SCHNELLER (39) nur in Mengen gefunden werden konnte, die dem Morphinverlust nicht äquivalent sind.

4. Einwirkung von Phenoloxydase auf Kaffeesäure/Pseudomorphin

Zur Untersuchung des Systems Phenoloxydase/Kaffeesäure/Pseudomorphin wurden wiederum Konzentrationen von 0,4 mg Kaffeesäure und 0,24 Cresolase-Einheiten Ferment pro ml Reaktionslösung (wie bei den manometrischen Messungen s.S.20) gewählt.

Reaktionsansatz:

10,0 mg Kaffeesäure/10,0 ml m/30-Phosphatpuffer pH 6,0

1,12 mg Pseudomorphin/12,5 ml Wasser

1,50 mg Kartoffel-Phenoloxydase/2,5 ml Wasser

Die Lösungen wurden zunächst 20 Minuten auf 25,0°C temperiert und dann in einem Reaktionsgefäß vereinigt. 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten nach Fermentzusatz wurde der Gehalt an Pseudomorphin in 1,25 ml Reaktionslösung bestimmt.

Da die Reaktion bei Zugabe des Fermentes spontan beginnt, ist eine exakte Bestimmung der Anfangskonzentration an Pseudomorphin (Reaktionszeit $t = 0$ min) auf diese Weise nicht möglich, und es wurde deshalb wie folgt verfahren: Ein zweiter Ansatz oben angegebener Zusammensetzung wurde gleichermaßen behandelt, jedoch statt der aktiven Fermentlösung durch Aufkochen inhibierte Fermentlösung zugesetzt und dann der Pseudomorphingehalt ermittelt. Als Blindlösung für die photometrische Bestimmung diente jeweils eine Lösung, die sich vom Reaktionsansatz nur durch das Fehlen des Pseudomorphins unterschied. Die Meßwerte sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß die gemessene Extinktion nach 45 Minuten Reaktionszeit ein Minimum erreicht und danach bis zum Abbruch der Reaktion nach 90 Minuten wieder ansteigt. Es erscheint sehr zweifelhaft, daß der Pseudomorphingehalt entsprechend der Extinktionsänderung erst ab- und dann wieder zunehmen soll. Aus diesem Grunde wurden papierchromatographische Versuche durchgeführt.

Tabelle 3: Änderung der Extinktion der Pseudomorphin-farbreaktion während der Einwirkung von Phenoloxydase/Kaffeensäure auf Pseudomorphin

t [min]	E	E (Mittelwert)	$(E_t - E_{t=0}) \cdot 10^3$
0	0,236 0,232 0,244 0,240	0,238	
15	0,176 0,178 0,184 0,187	0,181	- 57
30	0,138 0,132 0,142 0,136	0,137	- 101
45	0,090 0,088 0,076 0,081	0,084	- 154
60	0,100 0,102 0,096 0,102	0,100	- 138
90	0,110 0,128 0,125 0,127	0,122	- 116

Nach 90 Minuten wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung abgebrochen und 1,0 ml Reaktionslösung chromatographiert. Nach dem Besprühen mit Alkaloidreagenz trat keine Färbung mehr auf, Pseudomorphin war also nicht mehr nachzuweisen (Nachweisgrenze 3 γ).

Es war damit bewiesen, daß während der Reaktion Verbindungen entstehen, die mit Vanillin-Schwefelsäure ebenfalls eine Grünfärbung geben und dadurch das Ergebnis der Pseudomorphinbestimmung verfälschen. Diese Aussagen ließen sich bestätigen, indem die nach 15, 45 und 90 Minuten der Reaktionslösung entnommenen Proben nicht gegen die Blindwerte der gleichen Reaktionsdauer, sondern gegen die Blindprobe zur Reaktionszeit $t = 0$ min gemessen wurden; dabei stieg erwartungsgemäß die Extinktion laufend an (s. Tab.4). Der Pseudomorphingehalt läßt sich also aus der Reaktionslösung des Systems Phenoloxydase/Kaffeesäure/Pseudomorphin mit Vanillin-Schwefelsäure nicht bestimmen, wenn auch aus den bis zur 45. Minute gewonnenen Werten (s. Tab.3) ersichtlich wird, daß der Pseudomorphingehalt abnimmt. Die papierchromatographischen Untersuchungen zeigten, daß das Pseudomorphin sogar vollständig umgesetzt wird.

Die Ergebnisse sind nun insofern interessant, als sie gewisse Rückschlüsse auf die Umsetzung des Morphins im System Phenoloxydase/Kaffeesäure/Morphin zulassen. Ursprünglich wurde Pseudomorphin als Reaktionsprodukt erwartet, konnte aber trotz umfangreicher chromatographischer Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Die Versuche mit Phenoloxydase/Kaffeesäure/Pseudomorphin zeigen aber nun, daß Pseudomorphin kaum gefunden werden konnte, da es selbst, falls es während der Reaktion aus Morphin gebildet wird, weiter reagiert, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung des Pseudomorphins größer zu sein scheint als die des Morphins. Einen Hinweis darauf geben papierchromatographische Untersuchungen, die zeigten, daß durch Phenoloxydase/Kaffeesäure äquimolare Mengen Morphin und Pseudomorphin unterschiedlich schnell umgesetzt werden. In Reaktionsansätzen, die pro ml 0,24 Cresolase-Einheiten Kartoffel-Phenoloxydase,

Tabelle 4: Änderung der Extinktion der Pseudomorphinfarbreaktion im System Phenoloxydase/Kaffeensäure/Pseudomorphin bei Messung gegen den Blindwert zur Reaktionszeit $t = 0$ min

t [min]	E	E (Mittelwert)	$(E_t - E_{t=0}) \cdot 10^3$
0	0,236 0,232 0,244 0,240	0,238	
15	0,354 0,345 0,332 0,349	0,345	+ 107
45	0,395 0,390 0,404 0,407	0,399	+ 161
90	0,510 0,541 0,556 0,539	0,536	+ 298

0,4 mg Kaffeensäure und 35 γ Pseudomorphin ($= 5,6 \cdot 10^{-8}$ Mol) bzw. 21 γ Morphinhydrochlorid ($= 5,6 \cdot 10^{-8}$ Mol) enthielten, konnte nach 90 Minuten Reaktionszeit kein Pseudomorphin mehr nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 3 γ). Unter den gleichen Bedingungen war dagegen Morphin nach dem Besprühen mit Paulys Reagenz (42) noch sichtbar (Nachweisgrenze 10 γ).

Aus den Untersuchungen mit den Systemen Phenoloxydase/Kaffeensäure (bzw. p-Cumarsäure)/Pseudomorphin ergibt sich, daß Pseudomorphin durchaus kein so stabiles Oxydationsprodukt des Morphins darstellt, wie bisher anzunehmen war.

Die in-vitro-Versuche könnten eine mögliche Erklärung dafür sein, warum die bei der Opiumgewinnung festgestellten großen Morphinverluste keine oder nur eine geringe Zunahme der Pseudomorphinkonzentration zur Folge haben.

D. Experimenteller Teil

I. Beschreibung der Versuche

1. Manometrische Messungen

Die Aktivitätsbestimmungen der Phenoloxydasepräparationen und alle Messungen des Sauerstoffverbrauchs wurden in der Warburg-Apparatur bei 25,0°C mit 5,0 ml Reaktionslösung durchgeführt. Dabei befand sich die Fermentlösung in den an den Reaktionsgefäßen seitlich angebrachten Birnen und wurde erst nach einem viertelstündigen Temperatúrausgleich zum Substrat gegeben. Bei allen Warburg-Messungen diente m/75-Phosphatpuffer pH 6,0 nach MICHAELIS (45) als Lösungsmittel. Um Fehler durch Luftdruckschwankungen, Autoxydation usw. zu vermeiden, wurden alle Meßergebnisse durch Kontrollansätze, die außer dem Ferment alle Substanzen des Versuchsansatzes enthielten, korrigiert. Die Reaktionsgefäße wurden mit einer Frequenz von 120 Schwingungen/min geschüttelt.

2. Spektralphotometrische Messungen

Die Messungen wurden mit dem Zeiss-Spektralphotometer Modell PMQ II bei 25,0°C vorgenommen. Mit Ausnahme des Spektrums der Pseudomorphinfarbreaktion (2 cm - Glasküvetten) erfolgten die Messungen in 1cm-Quarzküvetten.

3. Quantitative kolorimetrische Pseudomorphinbestimmung

Alle quantitativen Pseudomorphinbestimmungen und die Aufstellung der dafür benötigten Eichgerade erfolgten im Zeiss-Photometer Elko II in 5cm-Glasküvetten mit dem Interferenzfilter J 62,2 bei 25,0°C.

4. Papierchromatographie

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden in der Chromatographie-Apparatur der Fa. Hormuth u. Vetter, Hei-

delberg, wie sie von FR. CRAMER (46) beschrieben wird, nach der absteigenden Methode auf Papier Schleicher u. Schüll 2043 b Mgl vorgenommen. Als Entwickler diente das Gemisch n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 (v/v/v; Oberphase). Vor dem Entwickeln wurden die Chromatogramme 4 Stunden äquilibriert. Zum Anfärben der Alkaloide wurde Kaliumjodid-Platinchloridchlorwasserstoff-Reagenz (47) benutzt, zur Sichtbarmachung der Zimtsäurederivate Paulys Reagenz (42).

II. Beschreibung der verwendeten Substanzen

1. Kartoffel-Phenoloxydase

Die Anreicherung des Fermentes aus der Kartoffelsorte "Ackersegen" erfolgte nach einer Vorschrift von F. KUBO-WITZ (34, 35) durch Aceton- und Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Dialyse. Alle Arbeiten fanden bei einer Temperatur von $+2^{\circ}\text{C}$ im Kühlraum und unter Vermeidung jeglichen Kontaktes mit Metallgegenständen statt, das Zentrifugieren erfolgte in einer Kühlzentrifuge bei 0°C . Die nach der Dialyse erhaltene wäßrige Fermentlösung wurde der besseren Haltbarkeit wegen lyophilisiert [†]). Auf diesem Wege wurden 2,30 g Trockenferment aus 20 kg Kartoffeln erhalten. Die zu den jeweiligen Versuchen gewünschten Konzentrationen wurden durch Lösen des Fermentes in bidestilliertem Wasser oder Phosphatpuffer hergestellt.

Die Angabe der Fermentaktivität erfolgte in Cresolase-Einheiten. Unter einer Cresolase-Einheit ist nach M. GRAUBARD und J.M. NELSON (48, 49) die Fermentmenge zu verstehen, die bei pH 6,0, $25,0^{\circ}\text{C}$ und einer Substratkonzentration von 9,0 mg p-Cresol/5,0 ml Reaktionslösung während der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit einen Sauerstoffverbrauch von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ zeigt. Die Fermentstammlösung wurde durch Lösen von 6,0 mg Trockenferment/ml Wasser hergestellt und enthielt 24-28 Cresolase-Einheiten/ml.

2. Champignon-Phenoloxydase

Einige Untersuchungen wurden mit Phenoloxydase aus Champignons ^{††}) durchgeführt. Die verwendete Stammlösung enthielt 10,0 mg Trockenferment/ml Wasser. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie bei der Kartoffel-Phenoloxydase angegeben.

[†]) Der Fa. Schering-AG sei an dieser Stelle für die Ausführung der Gefriertrocknung gedankt.

^{††}) Tyrosinase from Mushrooms, Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri (USA)

1,0 ml der Stammlösung hatte eine Aktivität von 38 Cresolase-Einheiten nach M. GRAUBARD und J.M. NELSON (48, 49).

3. Meerrettich-Peroxydase

Alle Versuche mit Peroxydase wurden mit einer von der Fa. Boehringer, Mannheim bezogenen Meerrettich-Peroxydase durchgeführt. Die Aktivität dieser Präparation wurde nach der von B. CHANCE und A.C. MAEHLY (50) erläuterten Guajakolmethode bestimmt. 0,03 ml Fermentlösung, die 1,00 mg Trockensubstanz Peroxydase/ml Wasser enthielt, wurde in einer 1cm-Küvette mit 0,05 ml frisch bereiteter 0,02m-Guajakollösung und 2,9 ml m/100-Phosphatpuffer pH 7,0 gemischt. Im Spektralphotometer wurde die Extinktion bei 470 nm festgestellt, dann 0,02 ml 0,04n-Wasserstoffperoxidlösung zugesetzt und die Zeit bis zur Erhöhung der Extinktion um 0,050 bei 25,0°C gemessen; sie betrug 10,05 sec. Die Berechnung der Aktivität erfolgte auf dem von H. LOTH (51) beschriebenen Weg und ergab eine Konzentration von $6,8 \cdot 10^{-9}$ Mol aktiver Peroxydase/mg Trockenferment.

4. Pufferlösung

Als Pufferlösung diente m/30-bzw. m/75-Phosphatpuffer pH 6,0 nach L. MICHAELIS (45). Die Einstellung wurde mit einer Glaselektrode kontrolliert, wodurch die Abweichung geringer als 0,1 pH-Einheit gehalten werden konnte.

5. Wasserstoffperoxid

Die für die Versuche mit Meerrettich-Peroxydase benötigte Wasserstoffperoxidlösung wurde durch Verdünnen von Perhydrol "Merck" hergestellt. Vor den betreffenden Versuchen wurde der Gehalt durch Titration mit n/10-Kaliumpermanganatlösung bestimmt.

6. Morphin

Es wurde Morphinhydrochlorid DAB 6 "Merck" verwendet. Alle

Mengen- und Konzentrationsangaben beziehen sich auf $(C_{17}H_{19}O_3N)HCl + 3 H_2O$. Die Berechnung des zur Ermittlung der Morphinabnahme im System H_2O_2 -Peroxydase-Morphin benötigten molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{260} = 415$) erfolgte aus der bei 260 nm gemessenen Extinktion einer Lösung von 10,00 mg Morphinhydrochlorid/100,0 ml m/30-Phosphatpufferlösung pH 6,0.- Nach der Chromatographie mit n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 erschien die Substanz bei Betrachtung unter der UV-Lampe und nach Sichtbarmachung einheitlich. Fp: 200°C Z. (Schmelzblock).

7. Pseudomorphin (2, 9)

Zur Darstellung des benötigten Pseudomorphins wurden 3,29 g Morphinhydrochlorid (entsprechend 2,5 g Morphinbase) in eine heiße Lösung von 17,55 ml n-Kalilauge und 230 ml Wasser gegeben. Die erkaltete Lösung wurde erneut erwärmt und innerhalb 50 Minuten eine Lösung von 2,9 g Kaliumhexacyanoferrat-III in 100 ml Wasser unter ständigem Einleiten von Kohlendioxid zugesetzt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abgenutscht, mit Wasser und Methanol gewaschen, mit Natriumkarbonatlösung (5%) aufgeköcht und wieder abgenutscht und gewaschen. Der Rückstand wurde in möglichst wenig verdünnter Salzsäure aufgenommen und dann mit so viel konzentriertem Ammoniak versetzt, daß sich die weiße Fällung wieder löste. Die alkalische Lösung wurde auf dem Wasserbad zur Entfernung des Ammoniaks eingeengt, wobei das Pseudomorphin ausfiel. Dieses wurde noch einmal abgesaugt, mit Natriumkarbonatlösung aufgeköcht, filtriert, gewaschen und ein zweites mal aus konzentriertem Ammoniak umkristallisiert. Nach dem Trocknen im Exsikkator verblieben 1,2 g grauweißes kristallines Pseudomorphin $(C_{34}H_{36}O_6N_2) \cdot 3 H_2O$. Fp: 328°C Z. corr. (Schmelzblock). Der zur Berechnung der Morphinabnahme im System H_2O_2 -Peroxydase-Morphin benötigte molare Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{260} = 23330$) des Pseudomorphins wurde aus der in Abb.6 (s.S.24) gegebenen Extinktion bei 260 nm errechnet.- Nach der Chromatographie mit n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 erschien die Substanz bei Be-

trachtung unter der UV-Lampe und nach Sichtbarmachung einheitlich.

Elementaranalyse nach Trocknung im Hochvakuum bei 50°C ⁺):

	C	H	N	
$C_{34}H_{36}O_6N_2$	71,81%	6,38%	4,93%	ber.
	70,74%	6,46%	4,91%	gef.

8. 3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeensäure) $C_9H_8O_4$

Die verwendete Kaffeensäure wurde von der Fa. C. Roth, Karlsruhe bezogen. Sie war als "purum, fast chromatographisch rein" deklariert und erwies sich nach Chromatographie mit n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 bei Betrachtung unter der UV-Lampe und nach Sichtbarmachung als einheitlich.
Fp: 197°C Z. (Schmelzblock).

9. 4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure) $C_9H_8O_3$

Die verwendete p-Cumarsäure wurde von der Fa. C. Roth, Karlsruhe bezogen und war als "purissimum, chromatographisch rein" deklariert. Nach der Chromatographie mit n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 erschien die Substanz bei Betrachtung unter der UV-Lampe und nach Sichtbarmachung einheitlich. Fp: 210°C Z. (Schmelzblock).

10. Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz

1,00 g Vanillin DAB 6 "Merck" wurde zu 100,0 ml Schwefelsäure (d = 1,84) zur Analyse gelöst. Die zur Pseudomorphinbestimmung verwendete Reagenzlösung war nicht älter als zehn Tage.

⁺) Die Elementaranalyse wurde ausgeführt vom Mikroanalytischen Laboratorium Bernhardt des Max-Planck-Instituts für Kohleforschung Mülheim/Ruhr

E. Zusammenfassung

=====

Die Arbeit beschäftigte sich mit dem Reaktionsablauf bei der Einwirkung der Phenoloxydase auf Morphin unter Zwischenschaltung phenolischer Überträger (p-Cumarsäure, Kaffeesäure).

Bei Anwesenheit der p-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure) findet durch das Ferment zunächst eine Hydroxylierung zur 3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeesäure) und anschließend eine Dehydrierung zur 3,4-Dioxozimtsäure statt. Die Annahme, daß letztere Morphin zu Pseudomorphin unter Rückbildung von 3,4-Dihydroxyzimtsäure nichtenzymatisch oxydiert, was einer Überträgerwirkung im Sinne von F. KUBOWITZ (34, 35) entspricht, konnte durch papierchromatographischen Nachweis der 3,4-Dihydroxyzimtsäure erhärtet werden. Die manometrischen Messungen ließen bei Zusatz von Morphin zu Phenoloxydase/p-Cumarsäure einen Mehrverbrauch an Sauerstoff erkennen, der dadurch zustande kommt, daß Morphin durch das gebildete Chinon oxydiert wird, wobei Pseudomorphin als Oxydationsprodukt des Morphins und 3,4-Dihydroxyzimtsäure als Reduktionsprodukt der 3,4-Dioxozimtsäure entstehen. Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, daß H.-G. SCHNELLER (39) inzwischen auch Pseudomorphin aus den Reaktionslösungen isolieren konnte, allerdings in Mengen, die dem festgestellten Morphinverlust nicht äquivalent sind. Eine Erklärung hierfür geben die folgenden Ergebnisse.

Pseudomorphin wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie das Morphin der Einwirkung von Phenoloxydase/p-Cumarsäure ausgesetzt. Durch kolorimetrische Bestimmung konnte eine 90%ige Pseudomorphinabnahme festgestellt werden, was auch durch papierchromatographische Untersuchungen bestätigt wurde. Pseudomorphin scheint demnach einer weitergehenden Oxydation zugänglich zu sein. Es gelang jedoch nicht, alkaloidische Reaktionsprodukte auf papierchromatographischem Wege nachzuweisen.

Nach den vorangehenden Ergebnissen sollte bei Ersatz der *p*-Sulfonsäure durch Kaffeesäure ein entsprechender Reaktionsverlauf erwartet werden, da ja die *p*-Sulfonsäure primär durch die Phenoloxylase zu Kaffeesäure oxydiert wird. Trotz umfangreicher chromatographischer Untersuchungen konnte aber kein Pseudomorphin nachgewiesen werden. Die manometrischen Messungen ergaben statt eines zu erwartenden Mehrverbrauchs in System Phenoloxylase Kaffeesäure Morphin eine Reduzierung der Sauerstoffaufnahme. Diese Ergebnisse sprechen somit gegen einen Reaktionsablauf, wie er beim System Phenoloxylase/*p*-Sulfonsäure Morphin vorliegt. Andererseits steht die von J. S. HALL (31) festgestellte Morphinabnahme bei Einwirkung von Phenoloxylase Kaffeesäure außer Zweifel. Wie aber Versuche mit authentischen Morphin- und Pseudomorphinmengen zeigten, wird das Pseudomorphin mit wesentlich größerer Reaktionsgeschwindigkeit von Phenoloxylase Kaffeesäure umgesetzt als das Morphin. Deshalb ist das Auffinden von Pseudomorphin als Oxydationsprodukt des Morphins in den Reaktionslösungen nicht zu erwarten. Die mit den manometrischen Messungen festgestellte verminderte Sauerstoffaufnahme bei Zusatz von Morphin zu Phenoloxylase Kaffeesäure dürfte auf einer Reaktionsinaktivierung beruhen. Es besteht dabei die Möglichkeit, daß trotzdem eine Oxydation des Morphins stattfindet, deren Registrierung aber wegen der stärkeren Inhibierung unmöglich ist. Die Ergebnisse schließen also nicht aus, daß der Umsetzungs des Morphins durch Phenoloxylase Kaffeesäure der für das System Phenoloxylase *p*-Sulfonsäure Morphin beschriebene Mechanismus analoge liegt; noch fehlen aber Beweise für diesen Reaktionsverlauf.

Bei den für die Variante mit Phenoloxylase verwendeten Fermentpräparaten aus Kartoffeln und Hefepilzen konnten keine Unterschiede, wohl aber graduelle Unterschiede festgestellt werden. Im System Phenoloxylase *p*-Sulfonsäure Morphin unterscheidet die Hefepilzen-Phenoloxylase einer zunehmenden Reaktionsinaktivierung, die bei der Kartoffel-Phenoloxylase nicht auftritt.

Eine Oxydation von Pseudomorphin durch Phenoloxydase erwies sich als ebenso unmöglich wie die des Morphins.

Dagegen ergaben Versuche mit Wasserstoffperoxid-Peroxydase, daß sowohl Morphin als auch Pseudomorphin von diesem Ferment angegriffen werden. Der Reaktionsverlauf bei der Oxydation des Morphins mit Peroxydase wurde spektralphotometrisch durch Messung der Änderung des UV-Spektrums verfolgt. Die Änderungen im Morphinspektrum wurden dahingehend gedeutet, daß Pseudomorphin als Oxydationsprodukt gebildet wird. Die Richtigkeit dieser Annahme konnte durch papierchromatographische Untersuchungen bestätigt werden. Andere alkaloidische Reaktionsprodukte konnten nicht gefunden werden, woraus geschlossen wurde, daß Pseudomorphin als alleiniges Reaktionsprodukt entsteht. Die Überschneidungen der Kurvenscharen der zu verschiedenen Reaktionszeiten aufgenommenen UV-Spektren deuteten auf das Vorliegen eines isosbestischen Punktes hin, was ebenfalls für das Vorliegen nur eines Reaktionsproduktes gesprochen hätte. Weitergehende Untersuchungen zeigten jedoch, daß Pseudomorphin selbst von Peroxydase angegriffen werden kann. Dadurch ist die Möglichkeit einer über das Pseudomorphin hinausgehenden Oxydation des Morphins durch Peroxydase nicht auszuschließen.

F. Literaturverzeichnis

=====

- (1) KIEFFER, L., Liebigs Ann.Chem. 103, 271 (1857)
- (2) POLSTORFF, K., Ber.dtsch.chem.Ges. 13, 86 (1880)
- (3) POLSTORFF, K., Ber.dtsch.chem.Ges. 19, 1760 (1886)
- (4) HESSE, O., Liebigs Ann.Chem. 235, 229 (1886)
- (5) FULTON, CH.C., Amer.J.Pharm. 105, 511 (1933)
- (6) BROOCKMANN, K. u. K. POLSTORFF, Ber.dtsch.chem.Ges.
13, 91 (1880)
- (7) BROOCKMANN, K. u. K. POLSTORFF, Ber.dtsch.chem.Ges.
13, 92 (1880)
- (8) FROMMING, K.-H., Pharmaz.Ztg. 105, 27 (1960)
- (9) DIETZEL, R. u. W. HUSS, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.phar-
maz.Ges. 266, 641 (1928)
- (10) YEH, S.Y. u. J.L. LACH, J.pharmac.Sci. 50, 35 (1961)
- (11) GUNDERSEN, E.G. u. J. MØRCH, Dansk Tidsskr.Farmaci
29, 181 (1955)
- (12) KOLLO, C., Bul.Soc.Chim.Romania 1, 3 (1919)
- (13) PELLETIER, J., Liebigs Ann.Chem. 16, 27 (1835)
- (14) HESSE, O., Liebigs Ann.Chem. 234, 253 (1886)
- (15) MACMILLAN, A.M. u. A. TINGLE, Amer.J.Pharm. 92, 810
(1920)
- (16) DUNNICLIFF, H.B., J.N. RAY u. G. SINGH, Proc.nat.Inst.
Sci.India 1, 107 (1935) ref. C. 108, I, 2816 (1937)
- (17) STARKENSTEIN, E. u. F. ZETTL, Naunyn-Schmiedebergs
Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 187, 259 (1937)
- (18) WOROSHZOW jr., N.N. u. A.T.TROSCHTSCHENKO, C.R.(Dokla-
dy) Acad.Sci.URSS 1935 II, 555 ref. C. 107 II, 1382
(1936)
- (19) ANNETT, H.E. u. H.D. SINGH, Pharmac.J. 109, 304 (1922)
ref. C. 93 IV, 1119 (1922)
- (20) ABRAHAM, A.C. u. J. RAE, Pharmac.J. 117, 3, 32 (1926)
ref. C. 97 II, 1439 (1926)
- (21) DOTT, D.B., Pharmac.J. 112, 337 (1924)
- (22) JERMSTAD, A., Pharmaz.Zentralhalle Deutschland 69, 693
(1928)
- (23) GONNERMANN, M., Pflügers Arch.ges.Physiol.Menschen Tie-
re 113, 168 (1906)

- (24) BERTRAND, G. u. V.J. MEYER, C.R.d.l'Acad.Sci. 148, 1681
(1909) ref. C. 80 II, 455 (1909)
- (25) BOURQUELOT, E., J.Pharmac.Chim. 4, 382 (1896)
- (26) BOUGAULT, J., J.Pharmac.Chim. 15, 49 (1902)
- (27) ANNETT, H.E., Biochem.J. 16, 765 (1922)
- (28) NILOW, W.I., W.P. NILOWA u. A.T. TROSCHTSCHENKO,
Biochimia 1, 165 (1936) ref. C. 108 II, 1614 (1937)
- (29) TRUE, R.H. u. W.W. STOCKBERGER, Amer.J.Bot. 3, 1 (1916)
- (30) WIECHULA, W., Dissertation Freie Universität Berlin 1955
- (31) SCHWALB, E., Dissertation Freie Universität Berlin 1959
- (32) SCHÖNBEIN, C.F., J.prakt.Chem. 105, 203 (1868)
- (33) PURR, A., Biochem.Z. 321, 1 (1950/51)
- (34) KUBOWITZ, F., Biochem.Z. 292, 221 (1937)
- (35) KUBOWITZ, F., Biochem.Z. 299, 32 (1938)
- (36) JAKSON, H., Biochem.J. 33, 1452 (1939)
- (37) WAGREICH, H. u. J.M. NELSON, J.Amer.chem.Soc. 60, 1545
(1938)
- (38) TRAUTNER, E.M. u. E.A.H. ROBERTS in KURSSANOW, A.L.,
Synthese u. Umwandlung der Gerbstoffe in der Tee-
pflanze, Beih.d."Pharmazie" 1, Berlin, VEB Verlag
Volk und Gesundheit 1954
- (39) SCHNELLER, H.-G., Dissertation Freie Universität Ber-
lin in Vorbereitung
- (40) KEESER, E., Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol.Pharm-
akol. 167, 267 (1932)
- (41) KEESER, E., Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol.Pharm-
akol. 171, 311 (1933)
- (42) Chromatographie, S. 146; herausgegeben von E.Merck AG
Darmstadt
- (43) FIRBAS, R., Pharmaz.Post 38, 735 (1905)
- (44) THORN, A.N. u. A. AGREN, Svensk farmac.Tidskr. 53, 33
(1949)
- (45) MICHAELIS, L., in Methoden d. Fermentforschung Band 1,
S. 780; herausgegeben von E. Bamann u. K. Myrbäck,
Verlag Georg Thieme, Leipzig 1941
- (46) CRAMER, FR., Papierchromatographie, 4.Auflage, S. 48;
Verlag Chemie, Weinheim 1958

- (47) Chromatographie, S. 136; herausgegeben von E.Merck AG,
Darmstadt
- (48) GRAUBARD, M. u. J.M. NELSON, J.biol.Chemistry 111, 757
(1935)
- (49) GRAUBARD, M. u. J.M. NELSON, J.biol.Chemistry 112, 135
(1935)
- (50) CHANCE, B. u. A.C. MAEHLY in Methods in Enzymology,
Band II, S. 770; herausgegeben von S.P. Colowick u.
N.O. Kaplan, Academic Press, New York 1955
- (51) LOTH, H., Habilitationsschrift Freie Universität Berlin
(1960)

Lebenslauf

Am 25. Juni 1933 wurde ich als Sohn des Drogisten Herbert Simon und seiner Ehefrau Margarete, geb. Richter in Leipzig geboren.

Von 1939-1943 besuchte ich die Grundschule in Bad Dürrenberg/Saale und anschließend die Oberschule für Jungen (Ernst-v.Harnack-Schule) in Merseburg/Saale, an der ich im Juni 1951 die Reifeprüfung bestand.

Am 1. September 1951 begann ich meine Praktikantenzeit in der Geiseltal-Apotheke in Neumark/Geiseltal und legte im August 1953 vor dem Prüfungsausschuß in Halle/Saale die pharmazeutische Vorprüfung ab. Anschließend arbeitete ich bis zu meiner Zulassung zum Pharmaziestudium an der Freien Universität Berlin im Mai 1955 als Apothekerassistent in der Geiseltal-Apotheke Neumark/Geiseltal und der Betriebspoliklinik-Apotheke der Leuna-Werke in Leuna. Nach sechssemestrigem Studium an der Freien Universität bestand ich die pharmazeutische Prüfung vor dem Prüfungsausschuß in Berlin im Mai 1958.

Als Kandidat der Pharmazie war ich von Juni bis November 1958 in der Cäcilien-Apotheke Berlin-Charlottenburg tätig. Danach nahm ich meine Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin auf und begann meine Doktorarbeit, die später unter Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. K.-H. Frömming fortgesetzt wurde, bei Herrn Prof. Dr. G. Schenck. Die Approbation als Apotheker wurde mir im Juli 1959 erteilt. Seit 1. Mai 1960 bin ich wissenschaftlicher Assistent am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren: H. Drawert, R. Hänsel, K.-F. Jahr, H. Lassen, W. Lautsch, J. Reinert, G. Rommeney, G. Schenck, B. Schmidt, K.E. Schulte, E. Vidic und E. Werdermann.

Xerografie-Druck:
Chemoprint OHG
Gießen